

01.6.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 4月23日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-118581  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-118581]

出願人 エーザイ株式会社  
Applicant(s):

REC'D 22 JUL 2004

WIPO

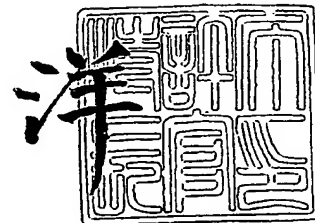
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 EP03SD0101

【提出日】 平成15年 4月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/12

【発明者】

    【住所又は居所】 佐賀市鍋島五丁目 1 番 1 号 佐賀医科大学内

    【氏名】 尾崎 岩太

【発明者】

    【住所又は居所】 佐賀市鍋島五丁目 1 番 1 号 佐賀医科大学内

    【氏名】 張 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 佐賀市鍋島五丁目 1 番 1 号 佐賀医科大学内

    【氏名】 水田 敏彦

【発明者】

    【住所又は居所】 佐賀市鍋島五丁目 1 番 1 号 佐賀医科大学内

    【氏名】 山本 匡介

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

    【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 004983

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 MMP 発現抑制剤及び癌細胞増殖抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 メナテトレノンを含む、MMP 発現抑制剤。

【請求項 2】 メナテトレノンを含む、癌の転移、浸潤の抑制剤。

【請求項 3】 メナテトレノンを含む、肝癌の転移抑制剤。

【請求項 4】 メナテトレノンを含む、転写因子 AP-1 の活性抑制剤

。

【請求項 5】 メナテトレノンを含む、転写因子 Ets-1 の発現抑制剤。

【請求項 6】 メナテトレノンを含む、癌治療の予後改善剤。

【請求項 7】 MMP の発現を抑制することによる癌細胞の転移抑制方法。

【請求項 8】 メナテトレノンを含む、癌細胞増殖抑制剤。

【請求項 9】 メナテトレノンを含む、CDK インヒビター p16、p21 又は p27 の発現促進剤。

【請求項 10】 メナテトレノンを含む、肝癌細胞増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、癌細胞による細胞外マトリックス分解酵素（MMP: matrix metalloproteinase）の発現を抑制することを特徴とする医薬、及び癌細胞の細胞増殖を抑制する医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞外マトリックス（ECM: extracellular matrix と呼ばれることもある）は、多細胞生物体を構成する各細胞を固定、接着させる不溶性成分の総称である。細胞外マトリックスは、細胞との接着を介してその増殖、分化に影響を与えることが知られており、その主なものとしては、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどがある。細胞外マトリックスは、細胞外マトリックス分解酵素（M

MP:matrix metalloproteinase、以下「MMP」と称する) という酵素によって分解されることが知られている。MMPは、受精卵が細胞分裂を繰り返しながら組織を発生・分化する際等に発現する酵素であるが、癌の浸潤、転移にも深く関わっており、癌の浸潤、転移にとって癌細胞周囲と血管基底膜の細胞外マトリックスの分解は必須のプロセスである。

### 【0003】

#### 【発明が解決しようとする課題】

従って、MMPの発現を抑制することによって、癌の浸潤、転移を抑制することができるが、MMPの発現を抑制する安全性の高い医薬はあまり開発されていなかった。

### 【0004】

#### 【課題を解決するための手段】

本願の発明者らは、意外にもメナテトレノン(ビタミンK-I I)がMMPの発現を抑制するという事、及び癌細胞の増殖を抑制することを発見した。本願発明の目的は、MMPの発現を抑制し、癌細胞の増殖を抑制する効果を有する安全性の高い医薬を提供することにある。

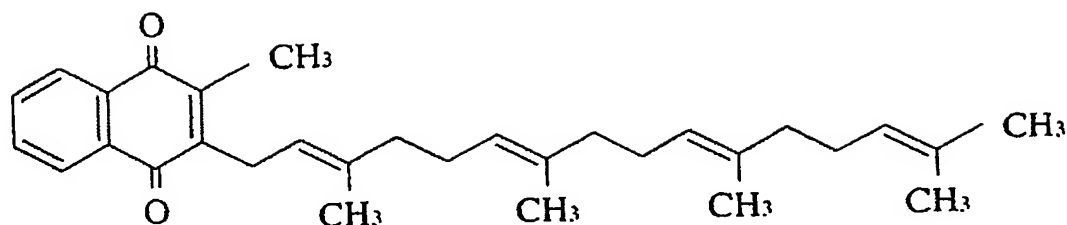
### 【0005】

本願発明は(1)メナテトレノンを含む、MMP発現抑制剤、(2)メナテトレノンを含む、癌の転移、浸潤の抑制剤、(3)メナテトレノンを含む、肝癌の転移抑制剤、(4)メナテトレノンを含む、転写因子AP-1活性抑制剤、(5)メナテトレノンを含む、転写因子Ets-1の発現抑制剤(6)メナテトレノンを含む癌治療の予後改善剤、(7)MMPの発現を抑制することによる癌細胞の転移抑制方法、(8)メナテトレノンを含む癌細胞増殖抑制剤、(9)メナテトレノンを含む、CDKインヒビターp16、p21又はp27発現剤、及び(10)メナテトレノンを含む、肝癌細胞増殖抑制剤である。

### 【0006】

メナテトレノンとは、化学名2-メチル-3-テトラプレニル-1,4-ナフトキノン(2-methyl-3-tetraprenyl-1,4-naphthoquinone)である。構造式を以下に示す。

## 【化1】



メナテトレノンとは黄色の結晶又は油状の物質で、におい及び味はなく、光により分解しやすい。また、水にはほとんど溶けない。メナテトレノンは、ビタミン K-I I とも称され、その薬理作用は、血液凝固因子（プロトロンビン、VII、IX、X）のタンパク合成過程で、グルタミン酸残基が生理活性を有する $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸に変換する際のカルボキシ化反応に関与するものであり、肝における正常プロトロンビン等の合成を促進し、生体の止血機構を賦活して生理的に止血作用を発現するものである。

## 【0007】

本発明にかかる医薬の有効成分であるメナテトレノンは、無水物であってもよいし、水和物を形成していてもよい。また、メナテトレノンには結晶多形が存在することもあるが限定されず、結晶形が単一であってもよいし、複数の混合物であってもよい。さらに、本発明にかかるメナテトレノンが生体内で分解されて生じる代謝物も本発明の特許請求の範囲に包含される。

## 【0008】

本発明において用いるメナテトレノンは、自体公知の方法で製造することができ、代表的な例として、特開昭 49-55650 号公報に開示される方法によれば容易に製造することができる他、合成メーカーから容易に入手することもできる。また、メナテトレノンはカプセル剤、注射剤等の製剤としても入手できる。本発明にかかる医薬は、メナテトレノンをそのまま用いてもよいし、または、自体公知の薬学的に許容できる担体等（例：賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH 調整剤、防腐剤、抗酸化剤等）、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合し

で慣用される方法により製剤化してもよい。また、必要に応じて、ビタミン類、アミノ酸、等の成分を配合してもよい。製剤化の剤形としては、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、パップ剤等があげられる。

また、本発明においては、メナテトレノンの投与形態は特に限定されないが、経口的に投与することが好ましい。メナテトレノンのカプセル剤は商品名ケイツーカプセル（エーザイ株式会社製）、グラケーカプセル（エーザイ株式会社製）として、またシロップ剤は商品名ケイツーシロップ（エーザイ株式会社製）として、注射剤は商品名ケイツーN注（エーザイ株式会社製）として入手することができる。

メナテトレノンの好ましい投与量としては通常は10～200mg/日であり、更に好ましくは30～135mg/日である。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

発明者らは、メナテトレノンが、癌細胞の、(1)増殖及び(2)浸潤・転移にどのような影響を及ぼすのかを研究するべく以下に述べる試験を行った。

#### 【0010】

(メナテトレノンによる癌細胞の増殖抑制作用の検討)

肝癌細胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLEにメナテトレノンを0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ Mの濃度で添加した後、48時間経過後にWSTアッセイにより細胞増殖の検討を行った。結果を図1(a)に示す。図1(a)から明らかなように、メナテトレノンを添加した細胞はいずれの細胞でも添加していない対照肝癌細胞に比べてその増殖が濃度依存的に抑制されることが分かった。

#### 【0011】

(細胞周期調節遺伝子発現の検討)

細胞増殖抑制機序を検討するために細胞周期の進行に関与する遺伝子の発現に着目し、細胞周期を進行させるCyclin dependent kinase(CDK)の阻害作用を有するCDK inhibitorであるp21、p27、p16の発現量がメナテトレノンの添加によって

どう変化するのかをRT-PCR法及びWestern blot法によって解析した。

(RT-PCR法)

本試験においては、肝癌細胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLEにメナテトレノンを0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ Mの濃度で添加した後、48時間経過後にRNAを回収し、total RNA  $1 \mu\text{g}$  よりRT-PCRを行い、p21、p27、p16の発現を調べた。コントロールとしてGAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)によるRT-PCRを行った。結果を図1(b)に示す。

(Western blot法)

本試験においては、肝癌細胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLEにメナテトレノンを0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ Mの濃度で添加した後、それぞれの細胞からタンパク質を抽出しSDS-PAGEによる電気泳動後、PVP膜にブロッティングし、抗p21、p27抗体とインキュベーションし、ECL法にてp21、p27のタンパク発現を調べた。結果を図1(c)に示す。

図1(b)、図1(c)から明らかなように、HepG2細胞ではp27及びp21mRNAはメナテトレノンの添加濃度依存的に増加がみられた。Hep3B細胞ではp21及びp16の軽度増加がみられたが、p27の変化は観察されなかった。Huh7細胞ではこれらの発現には変化がみられなかった。

【 0 0 1 2 】

(細胞周期の検討)

メナテトレノンが癌細胞の細胞周期に与える影響について、メナテトレノンを添加した肝癌細胞のDNA量による分布をフローサイトメトリー(FACS)により解析した。本試験においては、肝癌細胞HepG2、Huh7、Hep3B、HLEにメナテトレノンを0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ Mの濃度で加え48時間経過後にFACSによる細胞周期の変化を観察した。結果を図2に示す。図2より明らかなように、メナテトレノンの添加によりいずれの細胞においてもG1期の細胞の比率が濃度依存的に増加し、G2期の細胞の減少がみられた。これは、メナテトレノンが肝癌細胞の細胞周期においてG1期からS期への進行を抑制していることを示唆するものであり、メナテトレノンがG1 arrestを誘導することにより肝癌細胞の増殖を抑制しているものと考えられる。

## 【0013】

(癌細胞の浸潤・転移についての検討)

メナテトレノンの有する癌細胞の浸潤・転移を抑制する作用を検討するために、肝癌細胞 (HepG2) にメナテトレノンを 0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ M の濃度で加えて癌細胞のマトリゲル内の浸潤能を測定した。本試験においては、ダブルチャンバーの上室にマトリゲルをコートし、その上に癌細胞を撒き、メナテトレノンを添加した。下室にはフィーダーとして NIH3T3 細胞を撒いた。24 時間後にマトリゲルを通過して上室下面に移動した細胞数を顕微鏡下に観察した。結果を図 3 に示す。図 3 より明らかなように、メナテトレノンの添加濃度が大きいものほど上室下面に移動した細胞の数が減少していることが分かる。この結果により、メナテトレノンは濃度依存的に癌細胞のマトリゲル内浸潤能を抑制していることが分かる。

## 【0014】

メナテトレノンの及ぼす MMP の発現についての影響について (1) RT-PCR 試験、(2) Western blot 試験及び (3) ゲルシフトアッセイにより検討した。

(RT-PCR 法)

MMP の発現を検討するために RT-PCR 法による試験を行った。本試験においては各種肝癌細胞 (HepG2、Hep3B、Huh7) にメナテトレノンを添加した場合の各種 MMP (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-14 (MT1-MMP))、MMP の発現に影響を与える転写因子 Ets-1 及び細胞外マトリックス受容体である  $\beta 1$  インテグリンの発現を調査した。結果を図 4 に示す。図 4 から明らかなように、肝癌細胞によって発現している MMP の種類は一部異なっていたが、メナテトレノンの添加によって MMP-1、MMP-3、MMP-7 及び MMP-14 の mRNA の発現が濃度依存的に抑制されていることが分かる。また、転写因子 Ets-1 の発現も濃度依存的に抑制し、 $\beta 1$  インテグリン及び GAPDH の mRNA 発現には変化はみられなかった。

(Western blot 法)

MMP の発現を検討するために Western blot 法による試験を行った。本試験においては各種肝癌細胞 (HepG2、Hep3B、Huh7) にメナテトレノンを添加した場合



のMMP-1及びMMP-3の蛋白発現を調べた。結果を図5に示す。図5より明らかなように、メナテトレノンの添加によってMMP-1及びMMP-3の蛋白の発現が抑制されていることが分かる。

(ゲルシフトアッセイ)

MMPは、そのプロモーター領域に共通して転写因子AP-1、Ets-1、Tcf/Lefなどとの結合部位を有しており、MMPの発現を調節していることが知られている。MMPの発現を調節する転写因子AP-1、Tcf/Lefの結合活性がメナテトレノンの添加により変化するかどうかをゲルシフトアッセイにより試験を行った。本試験ではメナテトレノンを肝癌細胞HepG2に添加して24時間後に核蛋白を抽出、<sup>32</sup>PにてラベルしたAP-1、Tcf/Lefの結合部位を持つ二本鎖DNAと反応させた後、ゲルシフトアッセイを行った。結果を図6に示す。図6から明らかなように、メナテトレノンはTcf/Lefの結合活性には変化を与えなかったが、AP-1の結合活性を濃度依存的に抑制していることが分かる。この結合はラベル化されていない過剰のAP-1プローブでバンドが濃度依存的に減弱し(図中「10X」、「100X」)、変異AP-1プローブでは変化がなかった(図中「M」)。また、抗c-fos抗体によりバンドの減弱、シフトが見られた(図中「S」)。以上の結果より、メナテトレノンが特異的にAP-1の結合を抑制することが分かった。

#### 【0015】

#### 【発明の効果】

本願発明によると、メナテトレノンが転写因子Ets-1の発現およびAP-1の結合活性を抑制し、細胞外マトリックスを分解する酵素であるMMPの発現を抑制・防止することにより、癌細胞の浸潤、転移を抑えることができ、更に、癌細胞の増殖を抑えることができる。よって、癌細胞の浸潤、転移及び増殖を抑えることができる。また、癌治療の予後を改善することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 (a)はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞の増殖との関係を表わすグラフである。(b)はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞におけるCDKインヒビターの発現との関係を示すRT-PCR法による結果を表わす図である。(c)

はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞におけるCDKインヒビターの発現との関係を示すWestern blot法の結果を表わす図である。

【図2】 各種肝癌細胞にメナテトレノンを添加した際の細胞周期を表わす図である。

【図3】 肝癌細胞にメナテトレノンを添加した際の肝癌細胞の浸潤の抑制結果を示す図である。

【図4】 各種肝癌細胞にメナテトレノンを添加した際の各種浸潤関連因子の発現について、RT-PCR法にて検討した結果を示す図である。

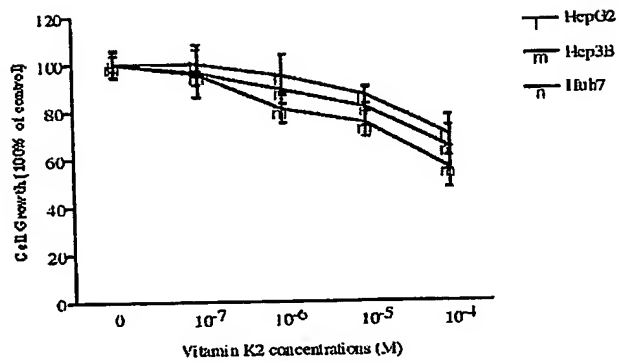
【図5】 各種肝癌細胞にメナテトレノンを添加した際の各種浸潤関連因子の発現について、Western blot法にて検討した結果を示す図である。

【図6】 メナテトレノンを添加した際の転写因子の活性化についてゲルシフトアッセイにて検討した結果を示す図である。

【書類名】 図面

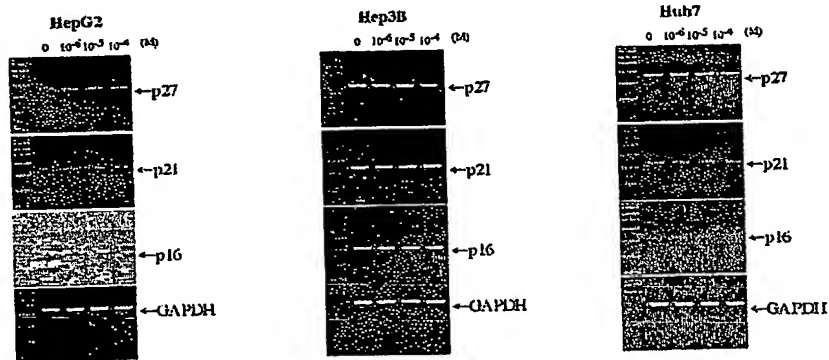
【図 1】

(a) Effect of Vitamin K2 (48 h) on the proliferation of HCC cells

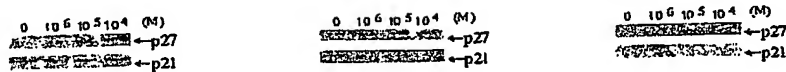


Effect of Vitamin K2 on the expression of the cyclin dependent kinase (Cdk) inhibitors (p27, p21, p16)

(b) RT-PCR

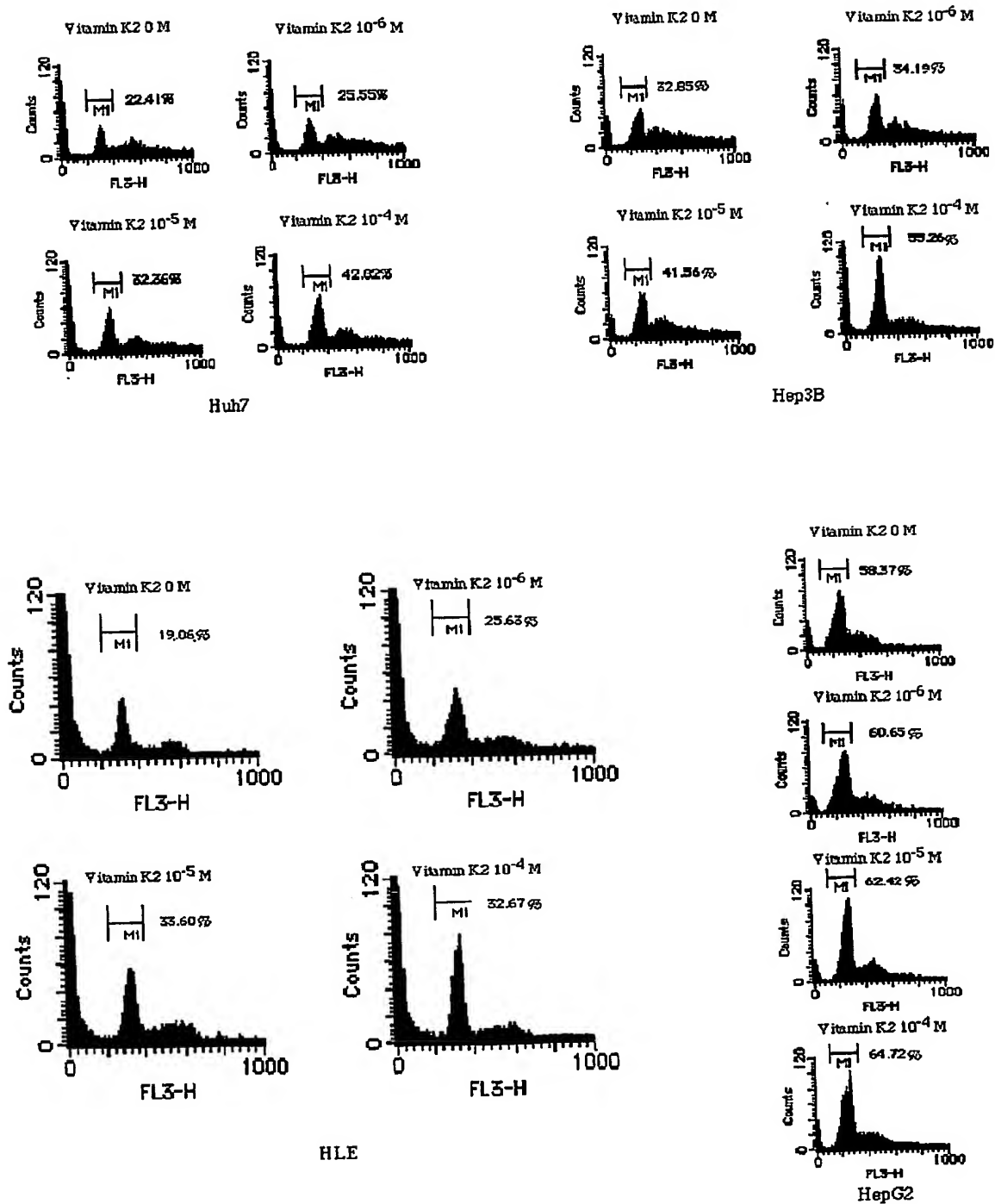


(c) Western blot



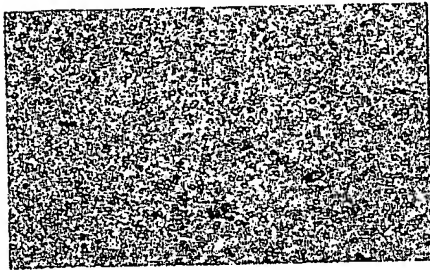
【図 2】

Vitamin K2 inhibited HCC cells proliferation through G1 arrest

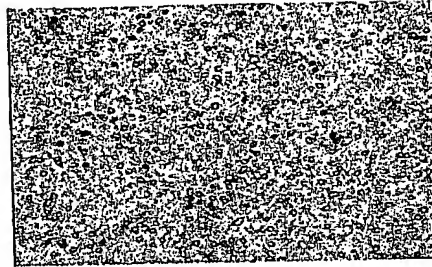


【図 3】

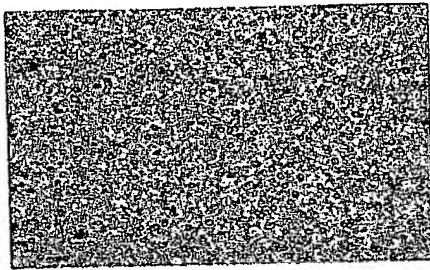
Vitamin K<sub>2</sub> dose-dependently inhibit the invasiveness of HepG2 cells



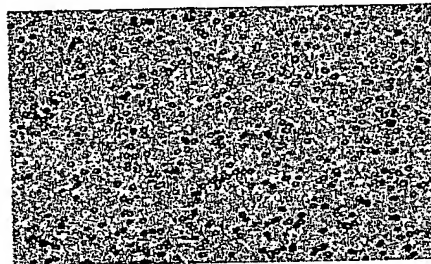
Vitamin K<sub>2</sub> 0 M



Vitamin K<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup> M



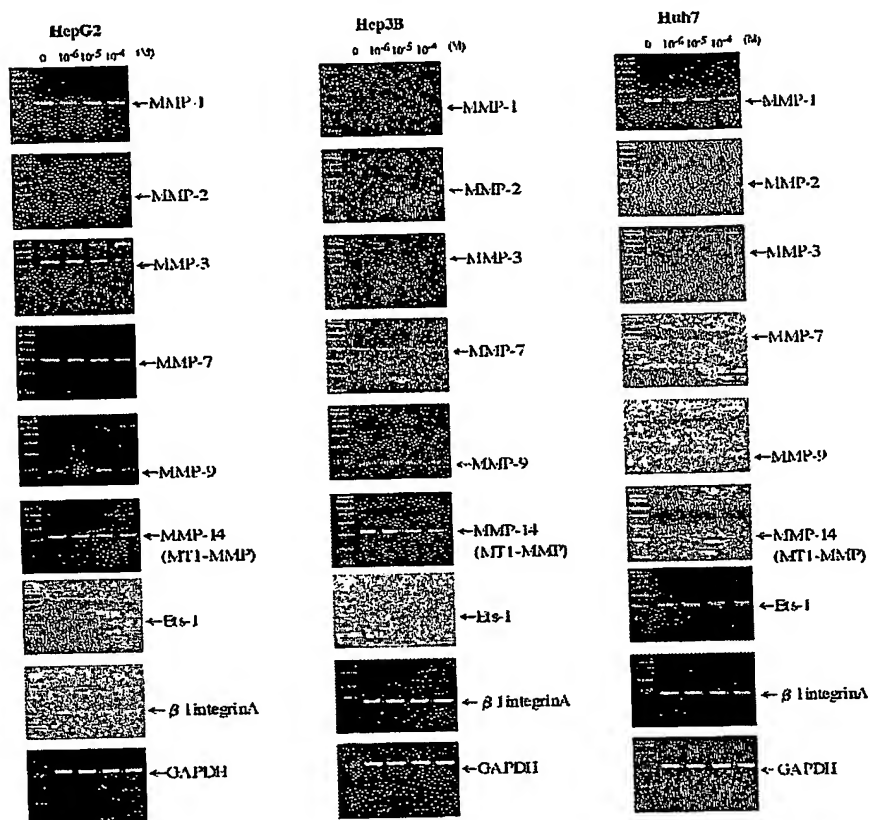
Vitamin K<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup> M



Vitamin K<sub>2</sub> 10<sup>-4</sup> M

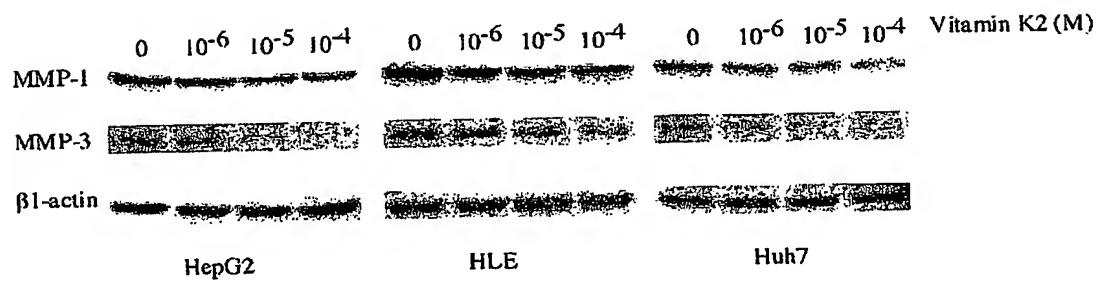
【図 4】

Effect of Vitamin K2 on the mRNA expression of some invasion-related factors



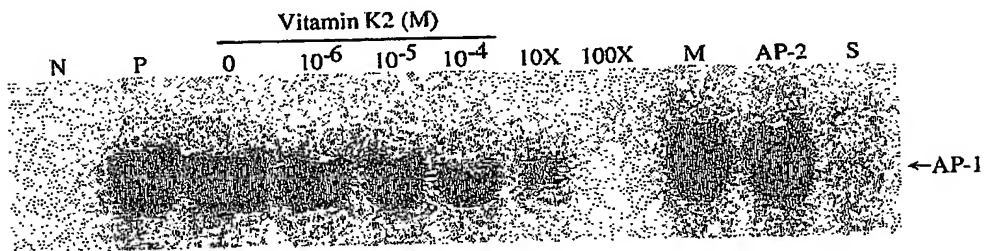
【図 5】

Vitamin K2 inhibit the expression of MMP-1 and MMP-3 protein in hepatoma cells



## 【図 6】

Effect of Vitamin K2 on AP-1 transcriptional factor by Gel Shift



N: negative control, no nuclear extract  
P: positive control, HeLa cells extract  
10X: 10 times no labeled AP-1 competitor  
100X: 100 times no labeled AP-1 competitor  
M: mutant AP-1 oligo  
S: super shift



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) は、受精卵が細胞分裂を繰り返しながら組織を発生・分化する際に発現する酵素であるが、癌の浸潤、転移にも深く関わっており、癌の浸潤、転移にとって癌細胞周囲と血管基底膜の細胞外マトリックスの分解は必須のプロセスである。MMP の発現を抑制することによって、癌の浸潤、転移を抑制することができるが、MMP の発現を抑制する安全性の高い医薬はあまり開発されていなかった。

【解決手段】 癌細胞による MMP の発現を抑制し、かつ癌細胞の細胞増殖を抑制する剤を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 1 8 5 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社